

Peningkatan Kadar TNF α Mencit BALB/c dengan Imunosupresi dan Diinfeksi *C.albicans* Akibat Pemberian Minyak Biji Mimba (*Oleum Azadirachty*)

lin Eliana Triwahyuni

Bagian Ilmu Penyakit Mulut

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Abstract

Fungal infection in oral cavity is mainly caused by *C.albicans* and now the case is reported increased. The increasing number of case is parallel with the increasing number of immunosuppressed patients. Oleum azadirachty, the active agent of mimba (*Azadirachta indica*) which is categorized as a herbal medicine that has been used as antifungal drug in agricultural field, and is also found to have immunostimulatory effect in animal model. In addition, TNF α has been known to reduce the spreading of *C. albicans* and also important for granulocyte antifungal activity. The aim of this research study is to clarify the effect of oleum azadirachty to TNF α level in BALB/c mice cervical lymph node that immunosuppressed and infected by *C.albicans*. This study used BALB/c mice that were divided in to six groups: which is consisted of three groups as control and three groups as studied groups. Mice were immunosuppressed by given 2-3mg/mice subcutan injection of prednisolon one day before inoculation. Group 2 until group 6 were given tetracycline hydrochloride in drinking water (0,83mg/ml) since one day before inoculation. *C.albicans* inoculation was given at zero day. At 2nd day post infection, mice were sacrificed and TNF α level was measured by ELISA. Data were analysed by One Way Anova test and LSD ($p=0.05$). Result of this research indicated that Oleum Azadirachty could increase the level of TNF α .

Key words : oleum azadirachty TNF α , immunosuppressed, *C.albicans*

Korespondensi (correspondence) : lin Eliana Triwahyuni, Bagian Ilmu Penyakit Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Jl. Kalimantan 1/37 Jember 68121, Indonesia

Saat ini terjadi peningkatan jumlah pasien yang mengalami penekanan atau penurunan sistem pertahanan tubuh atau biasa disebut imunosupresi maupun imunokompromais.¹ Hal ini menyebabkan angka kejadian infeksi jamur di rongga mulut mengalami peningkatan. Sebagian besar kasus infeksi jamur di rongga mulut disebabkan oleh jamur *Candida albicans*, penyakitnya disebut kandidiasis mulut, dan kasus kandidiasis mulut ini sering ditemukan di praktek dokter gigi.²

Selama ini kandidiasis mulut diterapi dengan obat-obat antijamur, antara lain azole, tetapi pemakaian obat-obat antijamur dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan terjadinya resistensi terhadap *Candida* dan berbagai efek samping. Hal ini menjadi faktor pendorong bagi masyarakat untuk memanfaatkan potensi obat tradisional khususnya yang berasal dari tumbuh-tumbuhan untuk pengobatan penyakit khususnya infeksi jamur.

Mimba (*Azadirachta Indica Juss*) telah dikenal masyarakat sebagai obat tradisional yang bermanfaat sebagai antijamur, antimalaria, antibakteri, antipiretik, imunomodulator, dan antiinflamasi. Bagian tanaman yang paling sering digunakan untuk obat tradisional adalah daun dan bijinya.^{3,4,5} Secara empiris, masyarakat telah memanfaatkan mimba untuk mengatasi berbagai macam penyakit, seperti : cacingan, kudis, malaria, infeksi jamur, mengatasi tumor dan alergi dengan cara minum rebusan daun atau biji mimba.^{6,7} Di bidang pertanian, biji mimba telah

dimanfaatkan sebagai insektisida, anti patogen dan fungisida alami yang terbukti aman bagi manusia dan hewan.^{8,9,10} Manfaat anti fungi tersebut dikarenakan adanya kandungan, terutama *azadirachtin*, trisulfida dan tetrasulfida pada daun dan biji mimba.

Potensi daun mimba sebagai imunostimulator telah dibuktikan oleh beberapa peneliti.¹¹ Peningkatan aktivitas PMN (Polimorfonuklear), makrofag dan limfosit akibat mimba pada tikus yang diinjeksi NIM-76 telah terbukti.¹² Sedangkan penelitian tentang efek powder dari daun kering mimba terhadap respons imun humoral dan seluler juga telah terbukti.¹³ Mimba dapat mempengaruhi peningkatan aktivitas fagositosis dan ekspresi MHC (*Major Histocompatibility Complex*) klas II, produksi IFN γ , dan proliferasi limfosit.¹⁴ Modulasi respons imun seluler dan humoral akibat mimba pada mencit yang diimunisasi dengan ovalbumin meliputi peningkatan level IgG, IgM, dan titer antibody anti-ovalbumin.¹⁵ Potensi imunomodulator ekstrak daun mimba terbukti meningkatkan aktivitas CD4, CD8 sel Th 1, dan makrofag pada tikus dan ker. ¹⁶

Candida albicans adalah flora normal rongga mulut yang menjadi penyebab utama terjadinya kandidiasis mulut. Kandidiasis mulut merupakan infeksi yang paling sering dijumpai di rongga mulut, karena hampir semua orang pernah mengalaminya. Adapun faktor predisposisi kandidiasis mulut meliputi : obat-obatan (terutama steroids, antibiotik), iritasi lokal (gigi tiruan, alat ortodonsi, rokok), radiasi, usia, kehamilan, penyakit sistemik, dan

malabsorpsi.¹⁷ Infeksi *Candida* disebut oportunistik, karena organisme tersebut dapat menjadi patogen pada keadaan sistem pertahanan tubuh kita terganggu. Dengan demikian faktor pertahanan tubuh sangat penting untuk mencegah terjadinya kandidiasis.^{18,19, 20}

Meskipun respons imunologik pada kandidiasis mulut belum banyak dipahami, namun diduga imunitas seluler lebih banyak berperan, meskipun respons humoral dan non spesifik juga ikut berperan. Respon imun seluler penting untuk proteksi hospes melawan semua jamur. Pada hospes yang imunokompromais, dapat terjadi transisi *C. albicans* menjadi pathogen oportunistik dan penyebarannya yang luas.²¹ Integrasi yang baik antara sistem imun innate dan adaptif dibutuhkan untuk mengontrol *C. albicans*.

Beberapa penelitian menunjukkan kaitan antara rendahnya TNF α di jaringan mulut dan saliva manusia dan hewan dengan kandidiasis mulut.²⁴ Hal ini menunjukkan bahwa penurunan TNF α berperan dalam kerentanan terhadap kandidiasis mulut. TNF α diketahui protektif terhadap penyebaran kandida pada hewan coba dan diketahui bahwa secara *invivo* TNF α penting untuk aktivitas antijamur granulosit.²⁵ Telah terbukti bahwa mencit dengan gen TNF α yang dihilangkan menyebabkan mencit sangat rentan terhadap kandidiasis sistemik sebab tidak adanya TNF α mengubah pengerahan dan fagositosis neutrofil.²⁶

Adanya respons imun yang berubah-ubah pada kandidiasis mulut, membuatnya menarik untuk dipelajari.^{17, 24, 27, 28} Sampai saat ini kandidiasis mulut diobati dengan obat-obatan antijamur yang bekerjanya langsung menghambat pertumbuhan jamur. Minyak biji mimba diharapkan selain menghambat pertumbuhan jamur secara langsung juga dapat meningkatkan sistem imun penderitanya, yaitu melalui sistem imun *innate* dan adaptif dimana salah satunya melalui peningkatan kadar TNF α mengingat bahwa pada imunitas terhadap kandidiasis mulut diperankan oleh integrasi sistem imun tersebut. Dengan demikian diharapkan kekambuhan kandidiasis mulut yang sangat mengganggu penderita dapat teratasi.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui apakah pemberian minyak biji mimba dapat meningkatkan kadar TNF α supernatan kultur makrofag *cervical lymph node* (CLN) mencit BALB/c dengan imunosupresi akibat pemakaian obat steroid (prednisolon) dan diinfeksi *C. albicans*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini adalah eksperimental murni yang dikerjakan di laboratorium secara *in vivo* dan *in vitro*. Pada penelitian ini akan digunakan model mencit BALB/c.

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan enam kelompok perlakuan, yaitu:

kelompok 1 (kontrol), kelompok 2 (kontrol positif 1: imunosupresi), kelompok 3 (kontrol positif 2: imunosupresi dan diinfeksi *C. albicans*), kelompok 4 (perlakuan 1: imunosupresi, diinfeksi, dan diberi minyak biji mimba 75 μ l), kelompok 5 (perlakuan 2: imunosupresi, diinfeksi, dan diberi minyak biji mimba 150 μ l), dan kelompok 6 (perlakuan 3: imunosupresi, diinfeksi, dan diberi minyak biji mimba 300 μ l). Digunakan mencit betina, umur 6-10 minggu, berat 20-30 gram. Sebelumnya mencit diadaptasi selama seminggu, dan diberi makan dan minum secara *ad libitum*.

Prosedur pembuatan minyak biji mimba.

Biji mimba yang telah dikeringkan dihancurkan kemudian diekstraksi dengan menggunakan alat ekstraksi *soxhlet* dengan pelarut hexan selama 3-4 jam. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya diproses dengan alat *rotary evaporator* untuk memisahkan pelarut dengan minyak, sehingga diperoleh minyak biji mimba.²⁹

Prosedur pembuatan model mencit dengan infeksi kandidiasis mulut.

Mencit diimunosupresi dengan cara memberikan prednisolon (PDS) dengan dosis 100 mg/kg BB (2-3 mg/mencit) secara subkutan sehari sebelum diinfeksi *C. albicans*. Tetrasiklin hidroklorid diberikan dalam air minum (0,83 mg/ml) sejak sehari sebelum diinfeksi. Mencit dianastesi dengan injeksi im 50 μ l dari 2mg klorpromazin klorid/ml pada daerah paha. *Cotton bud* dimasukkan ke dalam suspensi *C. albicans* (2,5x10⁷ sel/ml yang diukur dengan haematositometer) dan diulaskan ke seluruh permukaan rongga mulut untuk menimbulkan infeksi. Minyak biji mimba diberikan secara intragastrik sejak sehari sebelum diinfeksi.³⁰

Prosedur pemberian minyak biji mimba.

Minyak biji mimba dengan dosis 75 μ l, 150 μ l, dan 300 μ l untuk kelompok 4,5, dan 6 diberikan tiap hari dengan menggunakan sonde lambung sejak sehari sebelum diinfeksi *C. albicans*.

Kultur Makrofag.

Bahan yang digunakan adalah: nodus limfe leher, medium RPMI 1640, PBS, methanol absout, dan destiled H₂O. Sedangkan alat yang digunakan adalah: alat bedah, nylon mesh, haematocytometer, mikroplate 96, dan inkubator.

Suspensi sel nodus limfe leher dihitung dengan haematocytometer dan ditambahkan medium tumbuh sehingga didapatkan suspensi yang mengandung 2x10⁵ sel/ml, kemudian dimasukkan ke dalam mikroplate 96 sumuran sebanyak 1ml/sumur. Sel makrofag dibiarkan melekat selama 2 jam. Sel-sel yang tidak melekat dibuang, sedangkan sel-sel yang melekat dicuci dengan RPMI tanpa FBS (Fetal Bovine Serum) sebanyak 2 kali, kemudian diinkubasi dengan medium tumbuh selama 24 jam. Kemudian diambil supernatannya (untuk diukur kadar TNF α) dicuci 2 kali.

Penghitungan kadar produksi TNF α supernatan kultur makrofag *Cervical Lymph Node*. Bahan yang digunakan adalah:

supernatan kultur makrofag *cervical lymph node* mencit yang diambil pada hari ke-2, *coating buffer*, PBS *tween*, BSA, dan TNF α , antibodi sekunder anti IgG-AP, pNPP (paranitrophenyl phosphate), dan NaOH. Sedangkan alat yang digunakan adalah: plate ELISA 96, *mikropipet multichannel*, *mikrotip*, *chamber buffer*, dan ELISA reader.

Supernatan kultur makrofag *cervical lymph node* yang diperoleh diambil kemudian dilakukan pengukuran kadar TNF α dengan ELISA manual melalui prosedur kerja sebagai berikut: plate ELISA 96 sumuran dilapis dengan antigen berupa serum dan standar. Standar maupun antigen dilarutkan dalam *coating buffer* (1:50). Antigen di-*coating* pada plate ELISA selama semalam pada suhu 4°C, dicuci dalam PBS-*tween* 3x3menit. Kemudian diblok dengan *blocking buffer* (BSA 1% dalam PBS) 50 μ l/well dan diinkubasi selama 2 jam suhu

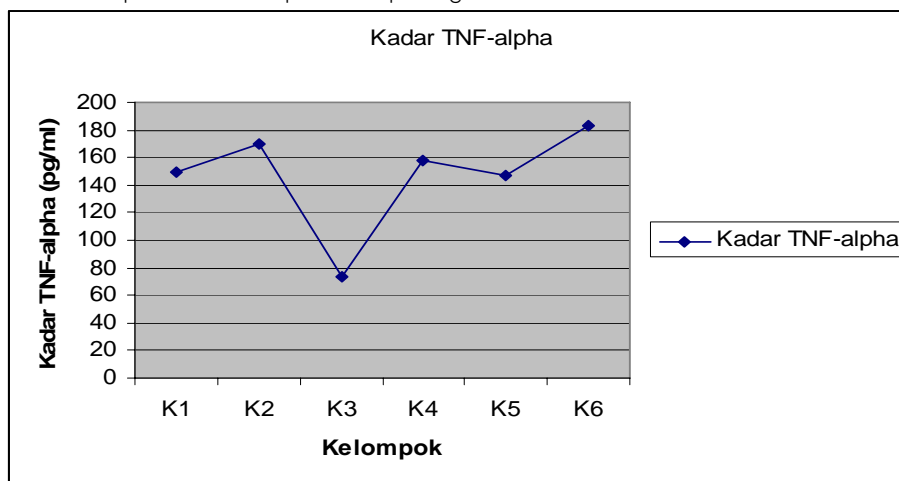
ruang. Selanjutnya dicuci dalam PBS-*Tween* 3x3 menit. Inkubasi plate dengan antiTNF α (1:10.000) selama 2 jam pada suhu ruang dilanjutkan dengan pencucian PBS-*Tween* 3x3 menit. Kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder anti-IgG-AP (berlabel alkalin phosphatase) (1:1000) selama 1 jam. Reaksi akhir dilakukan dengan pembentukan warna melalui penambahan substrat pNPP dalam dietanolamin 10% (50 μ l/well). Kemudian diinkubasi 30 menit pada suhu ruang (tidak dicuci, yang dibaca adalah pNPP yang terikat antibodi sekunder). Reaksi dihentikan dengan penambahan NaOH 3M (50 μ l/well) sebagai stop reaction. Kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 405 nm pada ELISA reader. Kurva standar dibuat berdasarkan kadar standar dan hasil absorbansi. Data yang diperoleh dianalisis dengan One Way Anova dilanjutkan uji LSD.

Hasil pemeriksaan kadar TNF α pada supernatan kultur makrofag dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Kadar TNF α pada semua kelompok

Perlakuan	Kadar TNF α ($\bar{x} \pm 1SD$) (pg/ml)
K1	149,00 \pm 8,01
K2	170,17 \pm 4,01
K3	73,17 \pm 6,36
K4	158,00 \pm 24,98
K5	147,50 \pm 10,61
K6	183,67 \pm 14,14

Grafik dari data pada tabel 1 dapat dilihat pada grafik 1 berikut ini.



Grafik 1. Kadar TNF α pada semua kelompok

Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan pengaruh yang nyata antar perlakuan terhadap kadar TNF α , dilakukan analisis data menggunakan uji Anova satu arah. Dari uji Anova diperoleh $p = 0,000$ atau artinya $p < 0,05$ berarti ada perbedaan kadar TNF α yang bermakna minimal antara sepasang kelompok.

Untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan yang ada diantara kelompok

sampel analisis dilanjutkan dengan menggunakan uji *Least Significant Difference* (LSD), yang hasilnya dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Uji LSD kadar TNFa antar kelompok

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5	K6
K1	-	0,017*	0,000*	0,263	0,848	0,001*
K2	0,017*	-	0,000*	0,139	0,012*	0,103
K3	0,000*	0,000*	-	0,000*	0,000*	0,000*
K4	0,263	0,139	0,000*	-	0,196	0,006*
K5	0,848	0,012*	0,000*	0,196	-	0,000*
K6	0,001*	0,103	0,000*	0,006*	0,000*	-

Keterangan: *= berbeda bermakna

Artinya ada perbedaan bermakna kadar TNFa pada kelompok kontrol negatif (K1) dengan kelompok kontrol positif 1 (K2), kelompok kontrol positif 2 (K3), dan kelompok yang diberi minyak biji mimba dosis 300µl (K6). Tidak ada perbedaan bermakna kadar TNFa pada kelompok yang diberi minyak biji mimba dengan dosis 75µl (K4) dengan 150µl (K5). Terdapat perbedaan bermakna kadar TNFa pada kelompok kontrol negatif 2 (K3) dengan semua kelompok.

DISKUSI

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek pemberian minyak biji mimba (*Oleum azadirachti*) terhadap kadar TNFa pada *cervical lymph node* mencit BALB/c dengan imunosupresi dan diinfeksi *C.albicans*. Pada penelitian ini pembuatan model mencit imunosupresi dilakukan dengan pemberian obat imunosupresan yaitu prednisolon dengan mengacu pada penelitian yang dilakukan Takakura pada tahun 2004. Dipilih prednisolon sebab kerja obat ini melalui penekanan terhadap proliferasi sel limfosit T yang sangat berperan dalam eliminasi *C.albicans*. Model mencit pada penelitian ini selain diberikan prednisolon juga diberikan antibiotik dengan tujuan mencegah terjadinya infeksi sekunder dari bakteri yang tidak diharapkan. Selain itu antibiotik menekan bakteri sehingga *C.albicans* lebih berpeluang untuk tumbuh dan pemakaian antibiotik merupakan salah satu faktor predisposisi terjadinya kandidiasis mulut.

Pada hasil penelitian dan analisis data didapatkan adanya peningkatan kadar TNFa (grafik 1), pada kelompok dengan perlakuan dengan minyak biji mimba dibanding dengan kelompok kontrol positif 2 (K3). kadar TNFa diamati dalam penelitian ini sebab merupakan komponen sistem imun *innate* yang berperan sebagai respon terhadap rangsangan dari luar, yang dalam penelitian ini dievaluasi melalui imunitas pada *cervical lymph node*, sebab merupakan salah satu sistem imunitas di rongga mulut. Sistem imunitas rongga mulut yang lain, meliputi: selaput mukosa mulut, jaringan limfoid mulut, dan sebagainya. Sistem imunitas rongga mulut ini selanjutnya akan mempengaruhi sistem imunitas sistemik melalui sistem vaskuler.

Dalam penelitian ini minyak biji mimba diberikan secara *oral* yaitu melalui sonde lambung. Selanjutnya komponen-komponen di dalamnya dapat diabsorpsi dengan cepat dalam mukosa membran usus dan dengan cepat diedarkan dalam darah, dengan *half life* dalam plasma lima jam, kemudian dengan cepat diabsorpsi ke dalam jaringan.³¹

Pada kelompok dengan minyak biji mimba (K4, K5, dan K6) kadar TNFa lebih tinggi dibanding kelompok K3 (grafik 1). Hal ini

membuktikan bahwa minyak biji mimba dapat meningkatkan kadar TNFa supernatan kultur makrofag dengan mekanisme yang sama dengan yang terjadi pada peningkatan aktivitas fagositosis makrofag, yaitu: Pada tikus Wistar yang diberi mimba terjadi peningkatan ekspresi CD14, TLR2, dan TLR4.³² Hal inilah yang dapat menjelaskan mekanisme peningkatan aktivitas fagositosis makrofag akibat mimba. TLR2 dan TLR4 merupakan reseptor pada permukaan makrofag yang berikatan dengan komponen mimba dengan perantara CD14 sebagai *co-receptor*. Akibat ikatan ini terjadi aktivasi protein Rac, ERK, NF- κ B, JNK, p38 melalui jun kinase, mengaktifkan IKK, menyebabkan degradasi I- κ B, sehingga p50 dan p65 translokasi dalam nukleus. Aktivasi NF- κ B mengaktifkan AP-1 yang mempengaruhi transkripsi mRNA dan menstimulasi ekspresi gen, antara lain fagositosis dan sitokin pro-inflamatori. TNFa merupakan sitokin pro-inflamatori yang dimaksud dalam hal ini. Selain itu mimba dapat meningkatkan kadar TNFa secara tidak langsung melalui IFN γ .^{14,31}

DAFTAR PUSTAKA

1. Bagtzoglou AD and Fidel PL., 2005, *The Host Cytokine Responses and Protective Immunity in Oropharyngeal Candidiasis*, J Dent Res 84(11): p. 966-977
2. Ashman RB, Farah CS, Wanasaengsakul S, Hu Y, Pang G, and Clancy RL, 2004, *Innate versus adaptive immunity in Candida albicans infection*, J. Immun and Cell Biol., 82, p. 196-204
3. Mirin A., 1997. Pengujian Kemampuan Beberapa Pengisida Nabati untuk Pengendalian Penyakit Layu Furasium pada Tomat. Jurnal Agrista Vol. (1) No. 2. Universitas Syak Kuala; 62-7.
4. Kardiman, 1999. Pestisida Hayati; Ramuan dan Aplikasi. Penebar Swadaya; J kulit batangta
5. Biswas K, Ishita C, Ranajit KB and Uday Bandyopadhyay, 2002, *Biological activities and medical properties of neem (Azadirachta Indica)*. Current Science, vol. 82, No. 11.
6. Ganguli S., 2002, *Neem : A therapeutic for all seasons*. Current Science;82(11).

7. Goel RK, K. Sairam, 2002, *Anti ulcer drugs from indigenous source with emphasis on musa sapientum, tamrabhasma, asparagus racemosus and zingiber officinale*. Indian J of Pharmacology;34:100-110.
8. Dangxuan T, Dgushi Y, Chikara J, Tsuzuki E, Terao H, Matsuo M, Tran DK, Nguyen HH, 2003, *Kava root (piper mythisticum) as a potential natural herbicide and fungicide*. Crop Protection;22:873-881.
9. Rahayu S, 1999. Efektivitas Ekastrak Daun Mimba dan Daun Sirih Terhadap Perkembangan Antraknosa (*Gleosporium piperatum* Ell. Et. Ev). Fakultas Pertanian Universitas Jember. Skripsi. Hal: 31.
10. Sukrasno, 2003. Mimba Tanaman Obat Multifungsi, Agromedia Pustaka
11. Sastrodihardjo, S., 1988. Evaluasi Daya Insektisida Dari Ekstrak Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. juss). Seminar Hasil Penelitian Pangan dan Gizi, Ilmu Hayati, 17 PAU: J kulit batangta. Hlm:18.
12. Sairam, Sharma SK, Havazhagan G, Kumar D, Selavamurthy W., 1997, *Immunomodulatory effect of NIM-76, a volatile fraction from Neem oil*. J Ethnopharmacol.;55(2):133-9.
13. Sadekar, Kolte AY, Barnase BS, Desai VF., 1998, *Immunopotentiating effects of Azadirachta indica (Neem) dry leaves powder in broilers, naturally infected with IBD virus*. Indian J Exp Biol.;36(11):1151-3.
14. Upadhayay DS, Garg S, Talwar GP., 1992, *Immunomodulation effects of neem Azadirachta indica) oil*. Int J immunopharmacol.;14(7):1187-93
15. Ray, Banerjee BD, Sen P., 1996, *Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by Azadirachta indica (Neem) in mice*. Indian J Exp Biol.;34(7):698-701.
16. Talwar, Rhaguvanshi P, Misra R, Mukerje S, Shah S, 1997, *Plant immunomodulatory for termination of unwanted pregnancy and for contraception and reproductive health*. Immunol cell Biol.;75(2):190-2, Unique Identifier: AIDSLINE MED/97261647.
17. Lehner, T, 1995. Immunologi pada Penyakit Mulut. Ed. 3. Terjemahan: Ratna Farida dan NG Suryadhana. *Immunologi of Oral Disease*. 1992. J kulit batangta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
18. Ernest JM and Adelberg. Geo F. Brooks, Janet S Butel, L. Nicholas Ornston. 1996. Mikrobiologi Kedokteran. Ed. 20. Alih Bahasa: Edi Nugroho, R.F Maulana. Judul Asli: *Medical Microbiology*. EGC: J kulit batangta.
19. Bunetel L, Martine B, Mallet, Kennes, Francis. 1996, *Oral Pathosis Caused by Candida albicans during Chemotherapy: Update on development mechanism*. Oral surgery Oral Med. Pathol Oral Radiol Endal; 82; 161-5.
20. Baratawijaya KG, 2006, *Imunologi Dasar* ed.6. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; J kulit batangta
21. Kadowaki N, Stephen H, Svetlana A, Rene WM, Robert AK, Fernando B and Yong-JL, 2001 *Subset of Human Dendritic Cell precursor Express Different Toll-Like receptors and Respond to Different Microbial Antigens*. The Journal of Experimental Medicine, vol.194:6:863-870.
22. Winarto dan Wibowo, 2005, Review Artikel. Peran Imunitas Seluler Lokal pada Kandididosis Vulvovagina Rekuren. File:///E:/imun_c_albican.htm. tanggal 5-12-2005.
www.tempo.co.id/medika/online/tmponline.co.id/pus-2.htm-18k-supplementalResult.retrieved.13 Juli 05.
23. Liu L, Kang K, Takahara M, Cooper RD, and Ghannoum MA, 2001, *Hyphae and Yeasts of Candida albicans Differentially Regulate Interleukin-12 Production by Human Blood Monocytes: Inhibitory Role of C. albicans Germination*, J Infect and Immun, Vol. 69 (7), p. 4695-4697
24. Farah CS, Hong S, Wanasangsakul, SES, G Pang, T. Gotjamanos, G.J Seymour, R.L Clancy, R.B Ashman. 2001, *Irradiation-Induced Oral Candidiasis in an Experimental Murine Model*, Oral Microbiol Immunol: 16: 358-363
25. Teichert M.C, B.A, J.W Jones, M.D.M.N Usacheva, PhD, DSc and M.A Biel, M.D, PhD, Minneapolis and St. Paul, Minn, 2002, *Treatment of Oral Candidiasis with Methylene-Blue Mediated Photodynamic Therapy in An Immunodeficient Murine Model*, Oral Surg Med Oral Pathol Radiol Endod. : 93: 155-60
26. Newman SL and Angela H. 2001. *Candida albicans Is Phagocytosed, Killed, and Processed for Antigen Presentation by human Dendritic Cells*. Infection and Immunity ;: Vol. 69: No. 11: 6813-6822.
27. Fouche M.H, B.D.S, M.Dent. J.C.G Slabbert, B.D.S, M.Dent, M.M Coogan, B.Sc,M.Sc, 1987, *Candidal Antibodies in Patients Undergoing Treatment for Denture Stomatitis*. The Journal of Prosthetic Dent: 57.
28. Boedina SK, 1996. Imonologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. J kulit batangta: Fak. Kedokteran Univ. Indonesia
29. Casey SD, 1994. *Neem: Mode of Action of Compounds Present in Extract and Formulations of Azadirachta indica Seeds and Their Efficacy to Pest of Ornamental Plants and to Non-Target Species*. Colorado State University. Fort Collins, Colorado 80523.
30. Takakura N, Wakabayashi H, Ishibashi H, Teraguchi S, Tamura Y, Yamaguchi H, and Abe S, 2004, *Effect of orally administered bovine lactoferrin on the immune response in the oral candidiasis*

- murine model*, J of Med Microb., 54, 495–500
31. Masquelier, Jack, 1980. *Pycogenols: Recent Advances in the Therapeutical Activity of Procyanidins, Natural Products as Medical Agents*, Beal, J.L. and Reinhard, E., E ds., Supplement of Plant Medica, Journal of Medicine Plant Research and Journal of Natural Products, Lloydia:vol.56. 243-55.
32. Dewanti, 2008, *Efek Ekstrak cair daun Mimba (Azadirachta indica) terhadap peningkatan Fagositosis makrofag pada Tikus Wistar yang Diinokulasi C.albicans*, Disertasi, Unair